Aus der Medizinischen Klinik der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning)

Dünnschichtchromatographische Trennungen von Substanzen des Serotonin- und Katecholaminstoffwechsels

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg 1963

vorgelegt von
Jürgen Krautheim
aus Erlangen

Erlangen 1963

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. med. G. Theissing
Referent: Prof. Dr. med. N. Heming

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 9. 1963

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
UTRECHT

Med. exp. 7: 8–14 (1962)

Aus der Medizinischen Klinik der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

Dünnschichtchromatographische Trennungen von Substanzen des Katecholamin- und Serotoninstoffwechsels *

Von E. Schmid, L. Zicha, J. Krautheim ** und J. Blumberg

Mit Hilfe der biologischen Techniken lassen sich lediglich pharmakologisch aktive Amine nachweisen. Dagegen gestatten die in den letzten Jahren verfeinerten fluorometrischen Methoden nicht nur die quantitative Bestimmung von Noradrenalin (NA), Adrenalin (A) und 5-Hydroxytryptamin (5-HT), sondern darüber hinaus auch von Dopamin (Dop), Normetanephrin (NM) und Metanephrin (M). Diese Technik ist jedoch mit hohem apparativen Aufwand verbunden und birgt die Gefahr zahlreicher Fehlermöglichkeiten in sich (3, 4, 11, 14, 15).

Daneben wurden auch einfachere Nachweismethoden für einzelne Metaboliten des Katecholamin- und Serotoninstoffwechsels entwickelt. Für die 5-Hydroxy-indolessigsäure (5-HIE) gilt heute die spektrophotometrische Bestimmung nach *Udenfriend* u. a. (14) als Methode der Wahl. Für die Vanillinmandelsäure (VMA) konnte *Armstrong* (1, 2) ein einfaches, routinemäßig verwendbares papierchromatographisches Verfahren entwickeln; *von Studnitz* (12) gab ein Trennungsverfahren mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese an. *Pisano* (5) sowie *Sandler und Ruthven* (6) beschrieben für die o-methylierten Metaboliten des Katecholaminstoffwechsels eine Methode, bei der das Reaktionsprodukt Vanillin ist.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
** D 29.

Eingegangen: 2. April 1962.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536528_0125

Als neues Trennungsverfahren steht seit 1957 die von *Stahl* (9) entwickelte Dünnschichtchromatographie zur Verfügung. Diese Methode bietet verschiedene Vorteile: 1. Der Zeitaufwand ist relativ gering. 2. Es können auch Steigflüssigkeiten und Färbungen verwendet werden, die sich für die Papierchromatographie nicht eignen. 3. Die Empfindlichkeit des Nachweises einzelner Stoffe kann gegenüber der Papierchromatographie erheblich gesteigert werden.

Da bisher nur einzelne Indole mit diesem Verfahren getestet wurden (10), versuchten wir dünnschichtchromatograpische Trennungen für Dop, Na, A, NM, M, VMA sowie 5-Hydroxy-tryptophan (5-HTP), 5-HT und 5-HIE zu entwickeln.

Methodik und Ergebnisse

Bei der Vorbereitung der Platten und der chromatographischen Technik wurden die Vorschriften von *Stahl* (9, 10) eingehalten.

Für die *Färbungen* der einzelnen Substanzen wurden folgende Reagenzien verwendet:

1. Ninhydrin, 0,2%ig in Butanol (95%) und 2 N Essigsäure (5%); Trocknung der Platte bei 103—105° C.
2. 2,6-Dichlorchinonchlorimid, 0,1%ig in Äthanol p.a.
3. Diazotiertes p-Nitranilin, p-Nitranilin 1%ig in Äthanol p.a. (50%) und 0,2%iger Natriumnitritlösung (Acq. bidest.) (50%). Nach dem Mischen sofortiges Aufsprühen.

Die Anfärbungen der Versuchssubstanzen sind in Tabelle I aufgeführt. Gegenüber Ninhydrin und p-Nitranilin besaß Dichlorchinonchlorimid den Vorteil, daß sämtliche Substanzen eine Farbreaktion ergaben und außerdem die Nachweisgrenze auf 0,1 μg (bei Ninhydrin bzw. p-Nitranilin 0,5—1 μg) gesenkt werden konnte. NA und A ließen sich außerdem auf dem Chromatogramm mit dem Verfahren nach *von Euler und Lishajko* (4) in fluoreszierende Verbindungen überführen.

Von zahlreichen geprüften *Steigflüssigkeiten* bewährten sich folgende Systeme:

1. Butanol : Pyridin : Eisessig (70 : 20 : 10).
2. Isopropanol : Äthylacetat : Ammoniak (d = 0,91; ca. 25%ig) (35 : 45 : 20).

Für die Überlassung von Dopamin-hydrobromid, Noradrenalinbase, Adrenalinbase danken wir der Burrough Wellcome Co., Bakenham (England) bzw. den Farbwerken Höchst. Normetanephrin, Metanephrin und Vanillinmandelsäure wurden von der MANN-Research-Laboratories. New York, 5-Hydroxytryptophan, 5-Hydroxytryptamin und 5-Hydroxyindolessigsäure von der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach (Baden) bezogen.

TABELLE I

Färbungen der untersuchten Testsubstanzen

Substanzen	Ninhydrin (nach Boratpufferbehandlung)	Dichlorchinonchlorimid (nach Boratpufferbehandlung)	Diazotiertes p-Nitranilin
Dop	hellbraun	braun	schwach hellbraun
NA	braun	braun	hellbraun
A	hellbraun	dunkelbraun	braun
NM	graubraun	hellblau	rötlich-gelb
M	lila	hellblau	rötlich-gelb
VMA	∅	blau	schwach rot
5-HTP	lilabraun	violett	lilabraun
5-HT	braun	violett	rotbraun
5-HIE	∅	graublau	rosa-violett
Histamin	rosa-blau	∅	∅

TABELLE II

R_f-Werte der untersuchten Testsubstanzen

Substanzen		Steigflüssigkeit 1	Steigflüssigkeit 2
Dop	(R)	—	0,29 (X)
	(G)	—	0,26 (X)
NA	(R)	0,35 (X)	0,13 (X)
	(G)	0,33 (X)	0,12 (X)
A	(R)	0,28 (X)	0,13 (X)
	(G)	0,28 (X)	0,12 (X)
NM	(R)	0,38	0,52
	(G)	0,38	0,50
M	(R)	0,25	0,54
	(G)	0,28	0,50
VMA	(R)	—	0,14
	(G)	—	0,12
5-HTP	(R)	—	0,18
	(G)	—	0,18
5-HT	(R)	—	0,61
	(G)	—	0,61
5-HIE	(R)	—	0,27
	(G)	—	0,24
Histamin	(R)	—	0,40

(X) = vom Startpunkt aus geschmiert. (R) = Reinsubstanz. (G) = Gemisch.

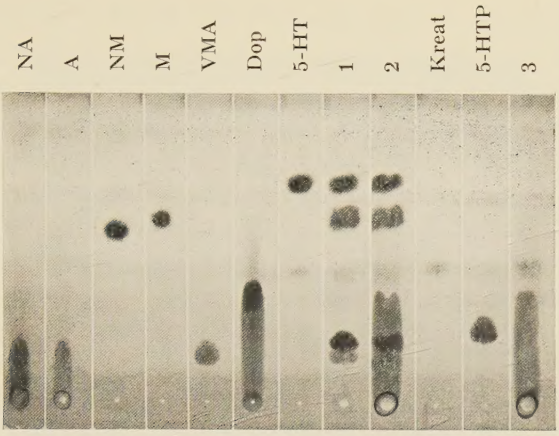

Abb. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung von Substanzen des Katecholamin- und Serotonin-Stoffwechsels. Aufgetragen wurden je 5 μg; Steigflüssigkeit 2. NA = Noradrenalin; A = Adrenalin; NM = Normetanephrin; M = Metanephrin; VMA = Vanillinmandelsäure; DOP = Dopamin; 5-HT = Serotonin; 1 = Gemisch aus VMA, 5-HTP, NM, M und 5-HT; 2= Gemisch aus NA, A, DOP, VMA, 5-HTP, NM, M und 5-HT; Kreat = Kreatinin; 5-HTP = 5-Hydroxytryptophan; 3 = Gemisch aus NA, A, DOP und Kreat.

Die R_f-Werte beider Untersuchungsreihen sind in Tabelle II zusammengefaßt. Die Laufstrecken wurden für die Reinsubstanzen und Gemische sowie im Zusatzversuch ermittelt. Da die Trennung bei Steigflüssigkeit 1 mit höherem Zeitaufwand verbunden war, bevorzugten wir weiterhin Gemisch 2. Bei Verwendung von 5-HT-Kreatininsulfat als Testsubstanz wurde der Kreatininsulfatrest getrennt dargestellt (Abb. 1). M und NM hatten beim System 2 etwa gleiche R_f-Werte und konnten daher nur als «Gesamtmetanephrine» erfaßt werden. A, NA und Dop ließen sich mit den oben erwähnten Verfahren nicht befriedigend trennen. Die R_f-Werte von NA und A waren jedoch bei Anwendung eines Gemisches von Butanol : Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,0) (80 : 20) verschieden (NA: 0,28; A: 0,18).

Bei *Extraktionsversuchen* konnten 70—80% der Metanephrine aus stark saurem, NaCl-gesättigten Milieu mit Butanol wiedergewonnen werden (vgl. 8). Für Vanillinmandelsäure und Oxyindolessigsäure eigneten sich Äthyläther und Äthylacetat nach vorhergehender Ansäuerung und Kochsalzsättigung (1, 7); die Wiedergewinnung betrug 70—90%. Äthylacetat besaß gegenüber dem Äthyläther den Vorteil, daß Kreatinin und andere bei der Chromatographie störende Substanzen nicht in den Extrakt übergingen.

Um die Methode auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen, wurden Harne gesunder Versuchspersonen mit und ohne Zusatz von 5-HIE und VMA sowie von Fällen mit Verdacht auf metastasierendes Carcinoid bzw. Phäochromocytom aufgearbeitet. Abb. 2 zeigt das

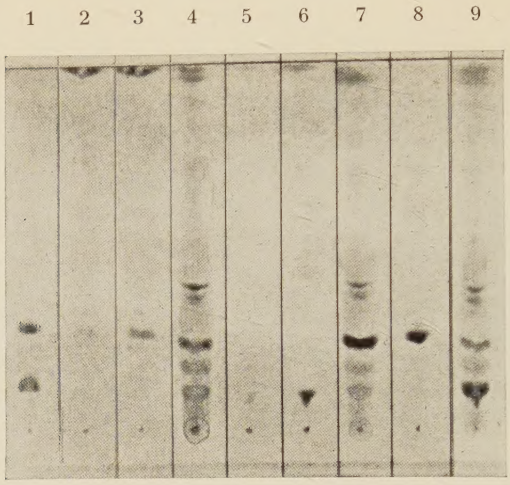

Abb. 2. Dünnschichtchromatographische Trennung von Harneluaten. 1 = je 5 µg 5-HIE und VMA; 2 = 1 µg 5-HIE; 3 = 5 µg 5-HIE; 4 = normaler Harn; 5 = 1 µg VMA; 6 = 5 µg VMA; 7 = Harn mit Zusatz von 50 µg 5-HIE/ml (aufgetragener Extrakt entspr. 0,5 ml Harn); 8 = 25 µg 5-HIE; 9 = Harn mit Zusatz von 50 µg VMA/ml (aufgetragener Extrakt entspr. 0,5 ml Harn).

Ergebnis einer dünnschichtchromatographischen Trennung der Testsubstanzen 5-HIE und VMA sowie von Harn mit und ohne Zusatz der Testsubstanzen.

Die Ergebnisse der semiquantitativen 5-HIE-Bestimmung entsprachen in 10 Versuchen den gleichzeitig quantitativ nach *Schön* u. a. (7) ermittelten Werten. In 4 Fällen mit Verdacht auf metastasierendes Carcinoid konnte mit beiden Methoden eine vermehrte Harnausscheidung des Serotoninmetaboliten ausgeschlossen werden. Bei 1 von 2 Fällen mit Verdacht auf Phäochromocytom lag die Tagesmenge an VMA mit etwa 6 mg im oberen Normbereich; Parallelbestimmungen der Harnkatecholamine [1] ergaben normale bzw. hochnormale Werte.

Diskussion

Substanzen des Katecholamin- und Serotoninstoffwechsels lassen sich mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie bei relativ geringem zeitlichen und materiellen Aufwand ausreichend tren-

[1] Die Bestimmungen wurden von Doz. Dr. *Kuschke,* Med. Klinik Würzburg bzw. Dr. *Kreppel,* Pharmakologisches Institut Bonn, ausgeführt.

nen. Die Brauchbarkeit der Methode konnte zunächst für den gleichzeitigen Nachweis der Metaboliten 5-HIE und VMA nachgewiesen werden. Die Technik kann daher als orientierender Test bei Fällen mit Verdacht auf Über-Produktion biogener Amine, d. h. beim metastasierenden Carcinoid und beim Phaeochromozytom Anwendung finden.

Wegen der hohen Empfindlichkeit bietet sich die Dünnschichtchromatographie auch für die Bearbeitung biochemischer Probleme auf dem Gebiete der biogenen Amine an. So ergaben orientierende Versuche, daß Serotonin von menschlichen Thrombocyten offenbar in Form des Kreatininsulfats gespeichert werden kann. Die Identifizierung anderer Inhaltsstoffe des Harnes, die mit den erwähnten Extraktionsverfahren miterfaßt werden können, ist noch im Gange.

Zusammenfassung

Dünnschichtchromatographische Trennungsverfahren für biogene Amine und ihre Stoffwechselprodukte werden beschrieben und auf ihre Brauchbarkeit als orientierende Schnelltests für die Diagnostik des Phaeochromocytoms und des metastasierenden Carcinoids geprüft.

Summary

Methods of separating biogenic amines and their metabolites by thin-layer chromatography are described together with the results of testing their utility as a quick diagnostic guide in pheochromocytoma and metastatic carcinoid.

Résumé

Les auteurs décrivent leur procédé de séparation par chromatographie en couche mince des amines biogènes et de leurs métabolites ; ils en ont contrôlé les possibilités d'utilisation comme test rapide d'orientation pour le diagnostic du phéochromocytome et du carcinoïde avec métastases.

Literatur

1. *Armstrong, M. D.; McMillan, A.* and *Shaw, K. N. F.:* 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. Biochim. biophys. Acta *25:* 422-423 (1957).
2. *Armstrong, M. D.; Shaw, K. F.* and *Wall, P. E.:* The phenolic acids of human urine. Paper chromatography of phenolic acids. J. biol. Chem. *218:* 293-303 (1956).

3. *Carlsson, A.* and *Waldeck, B.:* A fluorimetric method for the determination of dopamine. Acta physiol. scand. *44:* 293-303 (1958).
4. *von Euler, U. S.* and *Lishajko, F.:* The estimation of catecholamines in urine. Acta physiol. scand. *45:* 122-132 (1959).
5. *Pisano, J. J.:* Simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine. Clin. chim. Acta *5:* 406-414 (1960).
6. *Sandler, M.* and *Ruthven, C. R. J.:* The estimation of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid in urine. Biochem. J. *80:* 78-82 (1961).
7. *Schön, H.; Ordnung, W.* und *Schmid, E.:* Zum Nachweis der 5-Hydroxyindolessigsäure im Harn. Klin. Wschr. *38:* 405-406 (1960).
8. *Shore, P. A.* and *Olin, J. S.:* Identification and chemical assay of norepinephrine in brain and other tissues. J. Pharmacol. exp. Ther. *122:* 295-300 (1958).
9. *Stahl, E.:* Dünnschichtchromatographische Darstellungen in der Pharmazie (zusammenfassende Darstellung). Pharm. Rdsch. *2:* 1-6 (1959).
10. *Stahl, E.* und *Kaldewey, H.:* Spurenanalyse physiologisch aktiver einfacher Indolderivate. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *323:* 182-191 (1961).
11. *Straus, R.* and *Wurm, M.:* Catecholamines and the diagnosis of pheochromocytoma. Amer. J. clin. Path. *34:* 403-425 (1960).
12. *von Studnitz, W.:* Methodische und klinische Untersuchungen über die Ausscheidung der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure im Urin. Scand. J. clin. Lab. Invest. *12:* Suppl. *48* (1960).
13. Symposium on catecholamines, Bethesda, Md, 1958. Pharmacol. Rev. *11:* 233-566 (1959).
14. *Udenfriend, S.; Weissbach, H.* and *Brodie, B. B.:* Assay of serotonin and related metabolites, enzymes, and drugs. Methods of biochem. analysis *6:* 95-130 (1958).
15. *Weil-Malherbe, H.* and *Bone, A. D.:* The estimation of catecholamines in urine by a chemical method. J. clin. Path. *10:* 138-147 (1957).

Adresse der Autoren: Dr. E. Schmid, Dr. L. Zicha, J. Krautheim und J. Blumberg, Medizinische Universitätsklinik, Krankenhausstr. 12, *Erlangen* (Deutschland).

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. med. N. Henning für die freundliche Überlassung des Themas meiner Dissertation und die Übernahme des Referates zu danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. E. Schmid und Herrn Dr. med. L. Zicha für die jederzeit bereitwillig gewährte Unterstützung und wertvolle Beratung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 14. November 1937 wurde ich, Karl Louis Wilhelm Jürgen Krautheim, als Sohn des selbständigen Kaufmanns Alfred Krautheim und seiner Ehefrau Gerda, geb. Hübner in Oelsnitz/Vogtl. geboren. Von 1943 bis 1950 besuchte ich die Volksschule meiner Heimatstadt. Anschließend wurde ich als Internatsschüler in die Landesschule Schulpforta aufgenommen und nahm am humanistischen Unterricht bis 1953 teil. Die letzten beiden Klassen der Oberschule verbrachte ich im humanistischen Zweig der Thomasschule zu Leipzig, an der ich 1955 die Reifeprüfung bestand. Da mir von den Behörden der sowjetischen Besatzungszone die Zulassung zum Medizinstudium an einer mitteldeutschen Universität verweigert wurde, verließ ich die SBZ und legte nach Absolvierung eines dreivierteljährigen Lehrganges im August 1956 in West-Berlin die Ergänzungsprüfung zum mitteldeutschen Abitur ab. Darauf begann ich im Wintersemester 1956/57 mit dem Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen und bestand hier im April 1960 die ärztliche Vorprüfung und nach 6 Semestern klinischen Studiums am 23. August 1963 das medizinische Staatsexamen.